

泰山学者青年专家计划工作计划书

一、背景概述

(主要包括: 所属研究领域、国内外发展水平、申报人选在本领域内的研究基础等)

1. 研究领域

申请人长期从事神经精神药效、药理学及营养生物学研究, 在抑郁症的发病与治疗, 以及维生素 D (Vitamin D, VD) 的神经活性的探索中积累了丰富的研究经验。申请人将基础研究同临床相结合, 首次证明了 VD 的抗抑郁活性, 及其在抑郁症防治中的潜在价值, 为抑郁症的防治提供了新的思路。

2. 国内外发展现状

随着社会竞争压力的不断加大, 抑郁症已经成为严重危害人类健康、导致人类死亡的重要疾病之一。预计到 2020 年, 抑郁症会成为除心脏病之外给社会经济造成最大负担的一种疾病。然而, 现有的药物治疗对约 1/3 的抑郁症患者无效。因此, 进一步阐明其病理机制, 探索新的作用靶点, 寻找新的防治策略已变得迫在眉睫。

抑郁症是遗传因素和环境因素共同作用所导致的多基因疾病, 其病理机制复杂, 与长期社会心理应激有关。大量流行病学证据表明, 抑郁症患者经常伴有骨密度的降低与维生素 D (Vitamin D, VD) 的缺乏。随着对 VD 研究的日益深入, 其已从经典的钙磷稳态调节剂逐步演变成多功能的开环甾体激素, 在心血管、内分泌及免疫系统中发挥着至关重要的作用, 同时 VD 作为新型的神经活性甾体也影响着中枢神经系统的发育与功能。哺乳动物体内的 VD 首先在肝细胞内由 25-羟化酶代谢为 25(OH)D, 然后由 CYP27B1 激活生成 1,25(OH)2D, 最后由 CYP24A1 灭活。CYP27B1 与 CYP24A1 主要在肾脏表达, 通过负反馈机制调控着循环中的 VD 水平 (图 1)。然而, 最近大量研究表明在中枢神经系统中 VD 受体 (VDR) 和这些 VD 代谢酶也广泛表达, 说明脑内 VD 信号通路不仅受外周内分泌作用调节, 更重要的是它在脑内可能以自分泌或旁分泌形式

作用于相应受体，维持神经细胞正常生理功能。VD 在中枢神经系统中调控着炎症介质、多种神经营养因子及神经递质合成代谢关键酶的表达，其神经活性也受到越来越多的关注。因此不断有学者提出，VD 缺乏可能与抑郁症的发病过程有关。然而，由于体内 VD 主要在皮肤由 7-脱氢胆固醇经紫外线照射转化而来，还有少量的 VD 通过食物直接摄取，因此抑郁症患者体内较低的 VD 水平是抑郁症的致病因素之一，还是仅仅继发于抑郁症状（较少的户外活动与营养不良因素等）至今仍存在广泛争议。虽然最近几项大型前瞻性临床研究通过长期跟踪随访并对多种混淆因素进行校正后仍发现 VD 缺乏显著增加了抑郁症的患病风险，也不断有证据表明 VDR 基因多态性与包括抑郁症在内的多种神经精神疾病有关，但目前尚无大规模的随机对照临床实验对 VD 的抗抑郁作用进行确证，也缺少相应的基础研究对其可能的抗抑郁机制进行探讨。

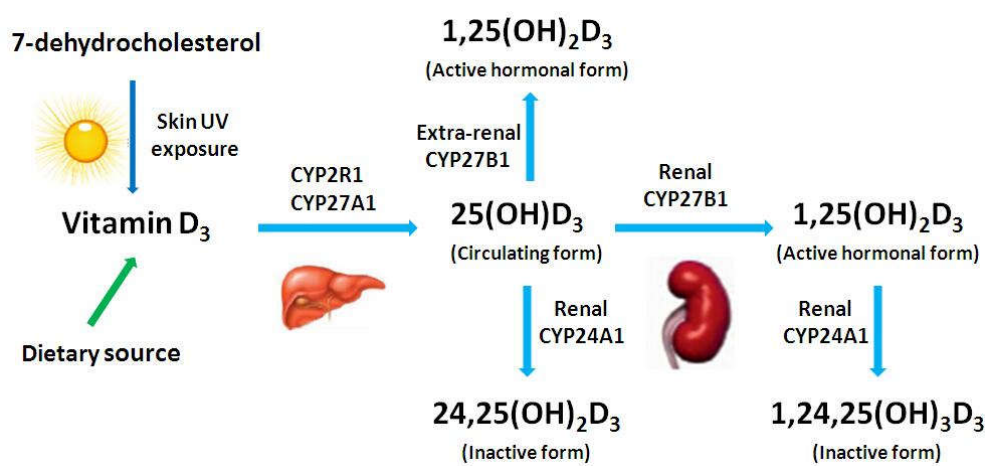


图 1. VD 体内代谢示意图

为论证 VD 缺乏与抑郁症之间的因果关系，并避免临床研究中多种混淆因素的干扰，本课题组率先开展了一系列基础研究。我们首次在两种抑郁大鼠模型脑内发现 VD 信号通路的紊乱。随后，我们成功构建 VD 缺乏（补充）大鼠模型，随后给予慢性应激（CMS）造模，发现 VD 缺乏显著增加了大鼠对应激的敏感性，而补充 VD 则部分缓解了行为学的改变。神经免疫反应现在被认为是抑郁症发病的核心环节，几乎可以影响到抑郁症病理机制的每一个方面。研究表明，应激所诱导的神经炎症反应主要与嘌呤受体 P2X7 受体（P2X7R）及其所调控的炎症小体（NLRP3）激活有关。P2X7R 为配体门控性离子通道，广泛分布于中枢神经系统中，可以被细胞外的 ATP 激活，并促进 Ca²⁺的内流，

进而诱导 NLRP3 的寡聚化，并募集凋亡相关斑点样蛋白（ASC）与 pro-caspase-1 形成炎症小体，使 pro-caspase-1 裂解为活性的 caspase-1，caspase-1 则会促进 pro-IL-1 β 裂解为活性的 IL-1 β ，最终导致炎症反应。VD 作为天然的免疫调节剂在多种自身免疫性疾病中都发挥着重要作用。为进一步探讨 VD 抗炎、抗应激的作用机制，我们考察了 VD 对应激激活炎症反应的核心机制 P2X7R/NLRP3 通路的影响，结果表明 VD 缺乏加剧了应激引起的 P2X7R/NLRP3 的激活，而补充 VD 有一定的缓解作用。VD 通过调控多种 Ca²⁺ 通道与 Ca²⁺ 结合蛋白，对细胞内 Ca²⁺ 浓度实现精细的调控，而 P2X7R 也可能是 VD 所作用的 Ca²⁺ 通道之一来影响免疫系统。体外实验表明 VD 可以阻止单核细胞因 P2X7R 激活所引起的 Ca²⁺ 内流的增加；我们通过分子对接也发现 VD 可以直接作用于 P2X7R，并通过 Pull-down 实验对该结果进行了验证，这也进一步提示 VD 可能是天然的 P2X7R 抑制剂，即通过调节 P2X7R 的活性和表达来发挥神经免疫调节作用，进而阻止长期应激所导致的免疫系统的过度激活，保护神经细胞，产生抗抑郁作用（图 1）。

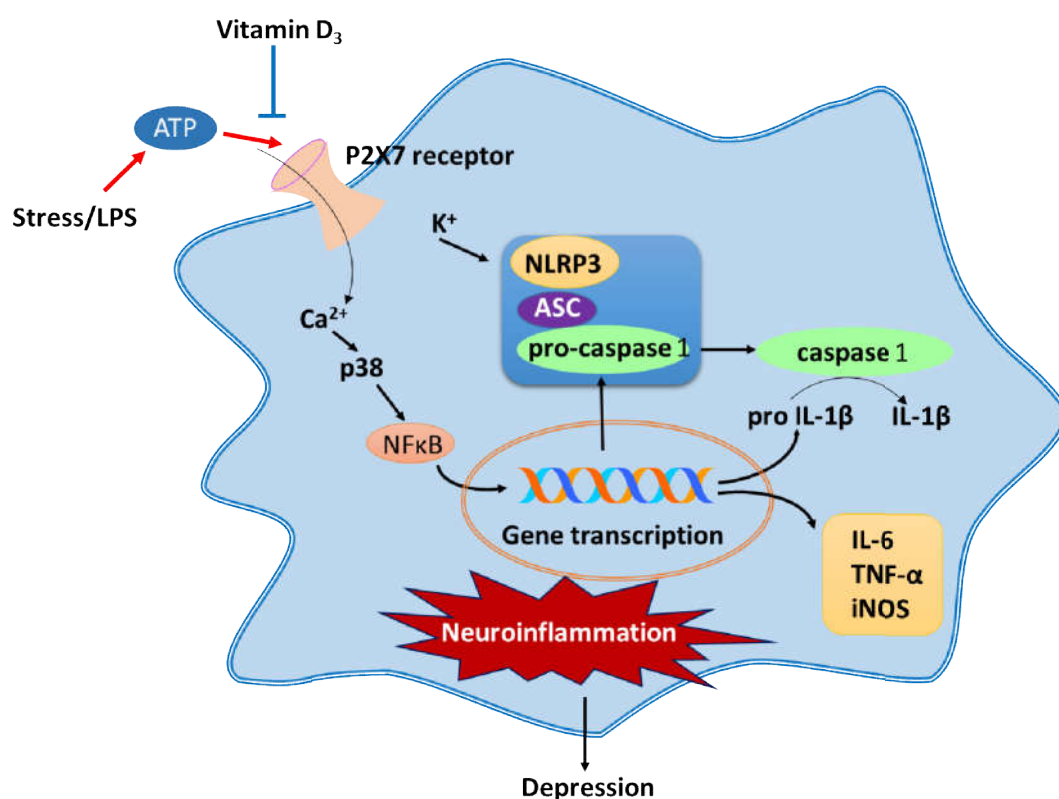


图 2. VD 经由神经免疫调节作用及其潜在的抗抑郁机制示意图

由此可见, 为进一步阐明 VD 的神经活性, 探究其与抑郁症的关系, 亟待
在现有的基础上深入开展工作。我们在前期研究中首次发现 P2X7R/NLRP3 通
路可能与 VD 的神经免疫调节及其抗抑郁作用密切相关。在此基础上, 我们拟
在细胞、动物和临床三个层面展开研究, 考查 VD 经由 P2X7R/NLRP3 对下游
的炎症因子的调控作用, 查明 VD 与抑郁行为及炎症水平三者的相关性, 明确
VD 的神经免疫调控作用和抗抑郁机制, 同时利用本课题组已构建的代谢组学
平台, 对多种靶标神经递质及代谢产物进行准确定量和多元统计分析, 对代谢
谱进行全扫描, 确定代谢轮廓的转归情况, 筛选 VD 干预下的生物标志物, 以
期进一步证实 VD 在抑郁症中的作用, 为探究抑郁症的病理机制和治疗策略提
供新的思路。

主要参考文献:

- [1] Jaaskelainen T, Knekt P, Suvisaari J, Mannisto S, Partonen T, Saaksjarvi K, Kaartinen NE, Kanerva N, Lindfors O. Higher serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are related to a reduced risk of depression. *Br J Nutr*. 2015;113:1418-26.
- [2] 党瑞丽, 郭玉金, 朱运贵, 江沛*. 维生素 D 的神经免疫调节作用及其与神经精神疾病的关系. *中华临床营养杂志*. 2015;23:250-4.
- [3] Milaneschi Y, Hoogendijk W, Lips P, Heijboer AC, Schoevers R, van Hemert AM, Beekman AT, Smit JH, Penninx BW. The association between low vitamin D and depressive disorders. *Mol Psychiatry* 2014;19:444-51.
- [4] Anglin RE, Samaan Z, Walter SD, McDonald SD. Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2013;202:100-7.
- [5] **Jiang P**, Zhu WY, He X, Tang MM, Dang RL, Li HD, Xue Y, Zhang LH, Wu YQ, Cao LJ. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. *Inter J Env Res Pub Heal*. 2015;12:13913-22.
- [6] **Jiang P**, Zhu MQ, Li HD, Liu YP, Cai HL, Zhang LM. Effects of vitamin D receptor polymorphisms on the risk of schizophrenia and metabolic changes caused by risperidone treatment. *Psychiatry Res*. 2014;215:806-7.
- [7] **Jiang P**, Zhang L, Zhu W, Li H, Dang R, Tang M. Chronic stress causes neuroendocrine-immune disturbances without affecting renal vitamin D metabolism in rats. *J Endocrinol Invest*. 2014;37:1109-16.
- [8] **Jiang P**, Zhang WY, Li HD, Cai HL, Xue Y. Repeated haloperidol administration has no effect on vitamin D signaling but increase retinoid X receptors and Nur77 expression in rat prefrontal cortex. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33:309-12.
- [9] **Jiang P**, Zhang WY, Li HD, Cai HL, Liu YP, Chen LY. Stress and vitamin D: altered vitamin D metabolism in both the hippocampus and myocardium of chronic unpredictable mild stress

- exposed rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:2091-8.
- [10] Ji LL, Tong L, Peng JB, Jin XH, Wei D, Xu BK, Wang ZY. Changes in the expression of the vitamin D receptor and LVSCCA1C in the rat hippocampus submitted to single prolonged stress. *Mol Med Rep*. 2014;9:1165-70.
- [11] **Jiang P**, Xue Y, Li HD, Liu YP, Cai HL, Tang MM, Zhang LH. Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. *Psychopharmacology*. 2014;231:3445-51.
- [12] Obradovic D, Gronemeyer H, Lutz B, Rein T. Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. *J Neurochem*. 2006;96:500-9.
- [13] Xue Y, He X, Li H*, Deng Y, Yan M, Cai H, Tang M, Dang R, **Jiang P***. Simultaneous Quantification of 25-Hydroxyvitamin D3 and 24, 25-Dihydroxyvitamin D3 in Rats Shows Strong Correlations between Serum and Brain Tissue Levels. *Int J Endocrinol*. 2015;2015.
- [14] Dang R[#], **Jiang P[#]**, Cai H, Li H, Guo R, Wu Y, Zhang L, Zhu W, He X, Liu Y, Xu P. Vitamin D deficiency exacerbates atypical antipsychotic-induced metabolic side effects in rats: involvement of the INSIG/SREBP pathway. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25:1239-47.
- [15] Wei R, Christakos S: Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 2015, 7(10):8251-8260.
- [16] Dulla YA, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H: Regulatory Mechanisms of Vitamin D3 on Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines in Microglial BV-2 Cells. *Neurochemical Research* 2016, 41(11):2848-2858.
- [17] Grudet C, Malm J, Westrin A, Brundin L: Suicidal patients are deficient in vitamin D, associated with a pro-inflammatory status in the blood. *Psychoneuroendocrinology* 2014, 50(50C):210-219.

3. 申报人在本领域的研究基础

申请人长期针对 VD 的神经活性和抑郁症的病理机制展开研究，正在承担的国家自然科学基金课题“基于对 PAI-1/tPA 和 BDNF/NGF 神经营养因子网络调控探讨维生素 D 的神经保护作用 and 抗抑郁机制”为本课题的开展奠定了坚实的前期基础。申请人现已以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 34 篇，对 VD 的多种神经活性已有充分的认识，积累了丰富的研究经验。在本领域中的主要研究工作如下：

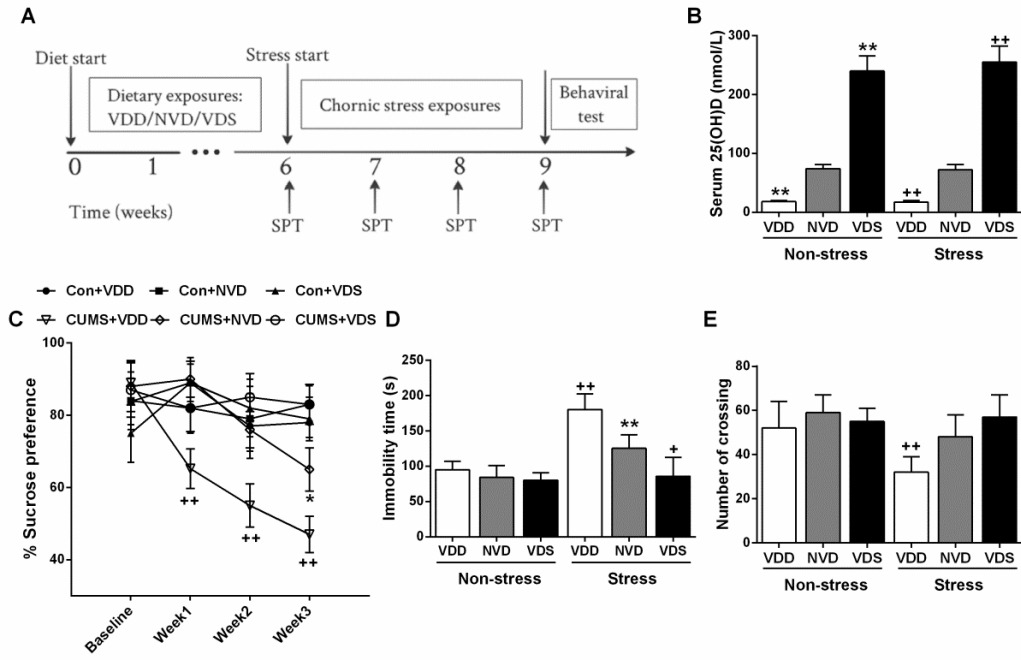


图 3. 不同水平的 VD 饮食对 CUMS 引起的行为学改变的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Non-stressed NVD group. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs stressed NVD group (VDD: vitamin D deficiency; NVD: normal vitamin D; VDS: vitamin D supplementation)

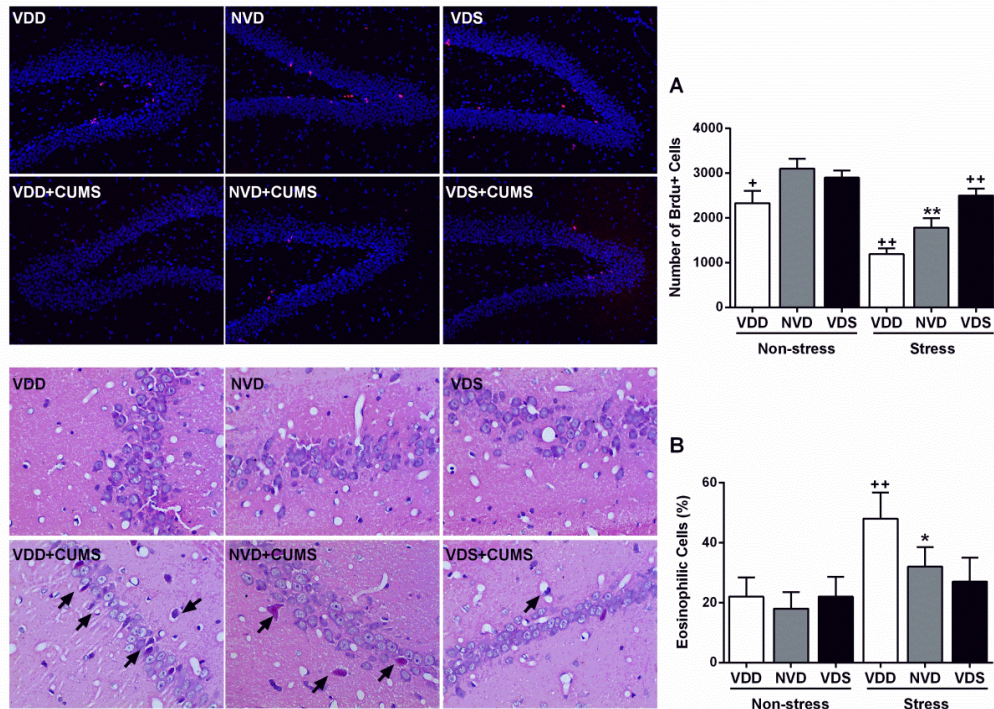


图 4. 不同水平的 VD 饮食和 CUMS 对神经再生和凋亡的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Non-stressed NVD group. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs stressed NVD group (VDD: vitamin D deficiency; NVD: normal vitamin D; VDS: vitamin D supplementation)

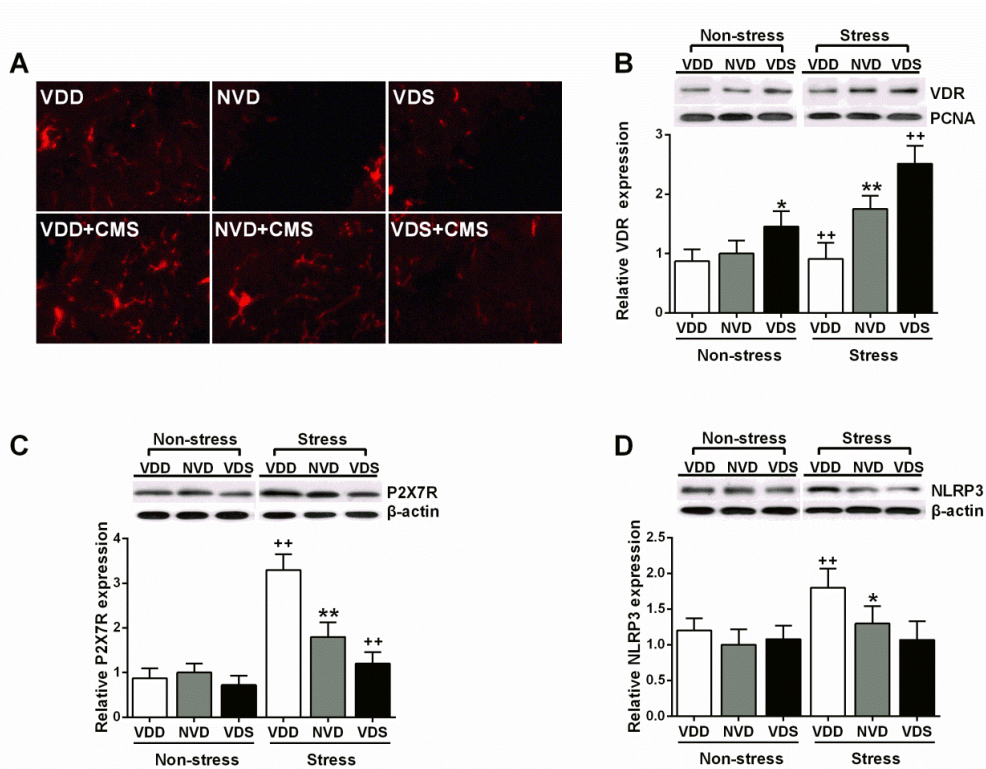


图 5. 体内 VD 水平对 CMS 引起的 P2X7R/NLRP3 的表达及小胶质细胞激活的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Non-stressed NVD group. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs stressed NVD group (VDD: vitamin D deficiency; NVD: normal vitamin D; VDS: vitamin D supplementation)

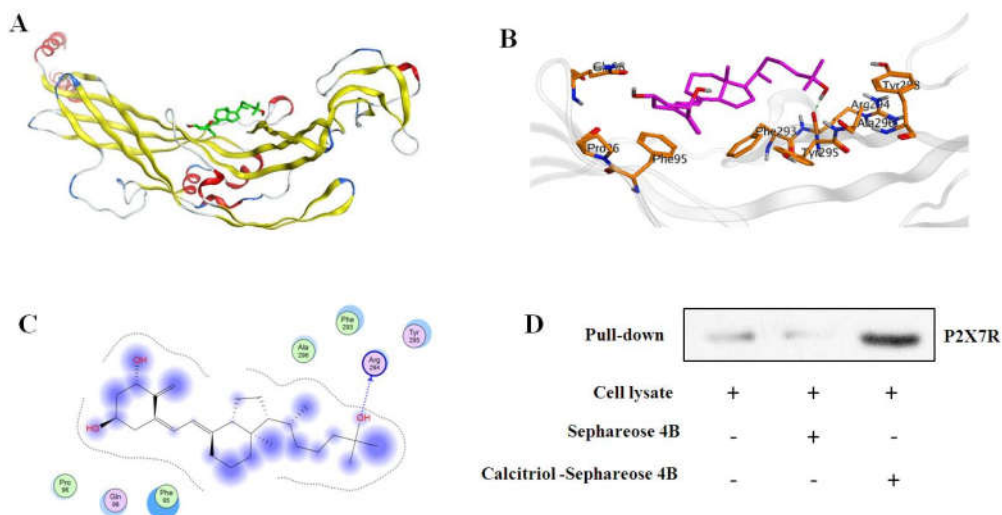


图 6. VD 与 P2X7R 分子对接研究及相互作用 (pull-down assay) 验证.

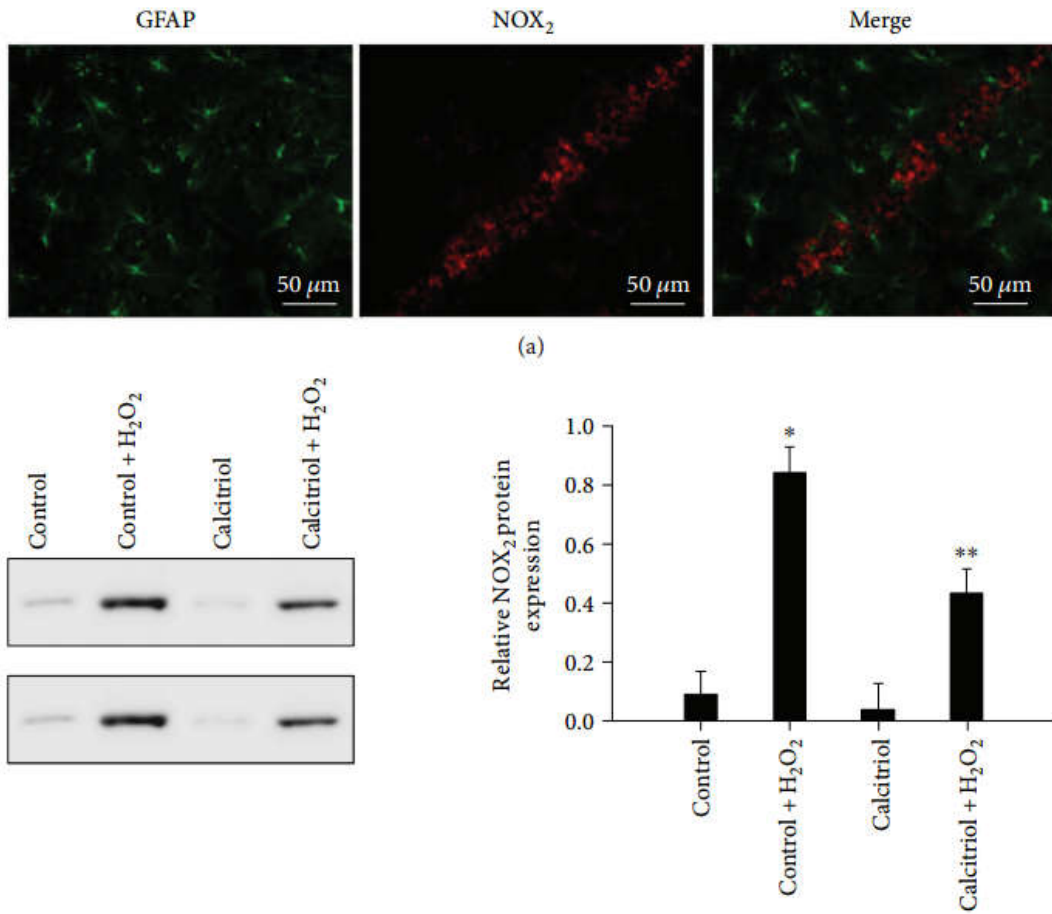


图 7. 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol) 的神经保护与抗氧化作用.

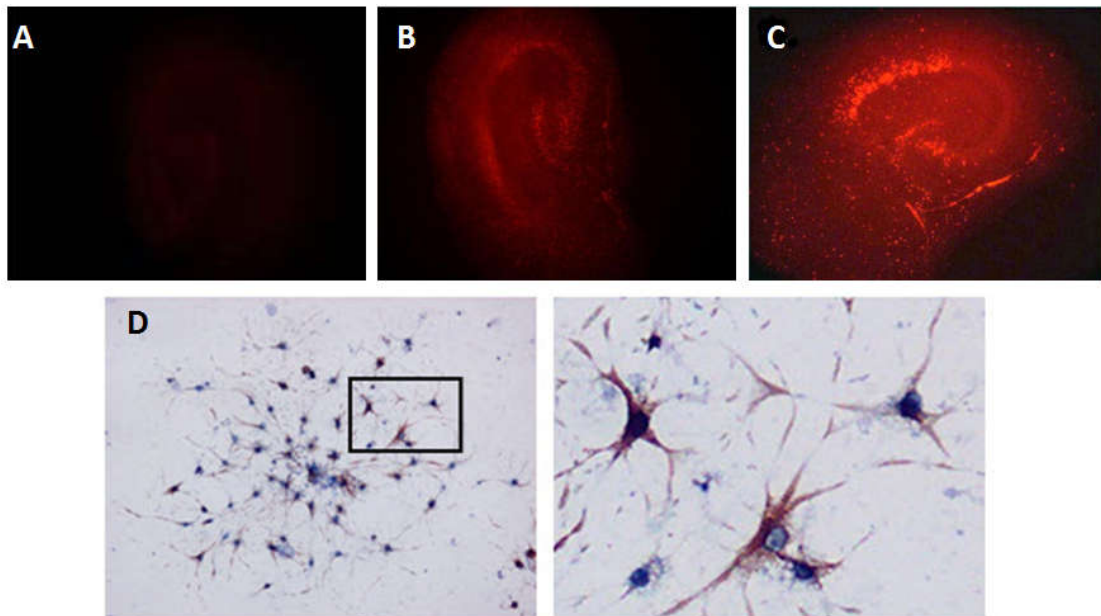


图 8. LPS 所诱导的海马器官型脑片 (OHSCs) 细胞凋亡 (PI staining); A: control; B: LPS 干预 12h; C: LPS 干预 24h. 与原代培养的海马神经细胞 (D)

所在领域发表主要文章列表:

- Jiang P**, Zhang WY, Li HD, Cai HL, Liu YP, Chen LY. Stress and vitamin D: altered vitamin D metabolism in both the hippocampus and myocardium of chronic unpredictable mild stress exposed rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(10):2091-8.
- Jiang P**, Guo Y, Dang R, Yang M, Liao D, Li H, Sun Z, Feng Q, Xu P. Salvianolic acid B protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammatory response: involvement of autophagy and NLRP3 inflammasome. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14(1):239.
- Jiang P**, Zhang WY, Li HD, Cai HL, Xue Y. Repeated haloperidol administration has no effect on vitamin D signaling but increase retinoid X receptors and Nur77 expression in rat prefrontal cortex. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(3):309-12.
- Jiang P**, Dang RL, Li HD. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. 2014;2014:729827.
- Jiang P**, Xue Y, Li HD, Liu YP, Cai HL, Tang MM, Zhang LH. Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. *Psychopharmacology*. 2014;231(17):3445-51.
- Jiang P**, Zhang L, Zhu W, Li H, Dang R, Tang M. Chronic stress causes neuroendocrine-immune disturbances without affecting renal vitamin D metabolism in rats. *Journal of endocrinological investigation*. 2014;37(11):1109-16.
- Jiang P**, Zhang LH, Cai HL, Li HD, Liu YP, Tang MM, Dang RL, Zhu WY, Xue Y, He X. Neurochemical effects of chronic administration of calcitriol in rats. *Nutrients*. 2014; 6(12): 6048-59.
- Jiang P**, Cai HL, Tan QY, Dang RL, Tang MM, Xue Y, Deng Y, Zhang BK, Fang PF, Xu P, Xiang DX, Li HD, Yao JK. Therapeutic efficacy of atypical antipsychotic drugs by targeting multiple stress-related metabolic pathways. *Translational psychiatry*. 2017;7(5):e1130.
- Jiang P**, Zhu MQ, Li HD, Liu YP, Cai HL, Zhang LM. Effects of vitamin D receptor polymorphisms on the risk of schizophrenia and metabolic changes caused by risperidone treatment. *Psychiatry research*. 2014;215(3):806-7.
- Jiang P**, Zhu WY, He X, Tang MM, Dang RL, Li HD, Xue Y, Zhang LH, Wu YQ, Cao LJ. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. *International journal of environmental research and public health*. 2015;12(11):13913-22.
- Dang R, **Jiang P# (co-first author)**, Cai H, Li H, Guo R, Wu Y, Zhang L, Zhu W, He X, Liu Y, Xu P. Vitamin D deficiency exacerbates atypical antipsychotic-induced

- metabolic side effects in rats: involvement of the INSIG/SREBP pathway. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2015;25(8):1239-47.
- He X, **Jiang P# (co-first author)**, Xue Y, Zhu WY, Deng Y, Yan M, Li HD, Dang RL, Tang MM. Simultaneous analysis of 25OHD3 and 24,25(OH)2D3 both in human serum and cerebrospinal fluid by LC-MS/MS. *Analytical Methods*. 2016;8:2400-7.
- He X, **Jiang P# (co-first author)**, Zhu W, Xue Y, Li H, Dang R, Cai H, Tang M, Zhang L, Wu Y. Effect of Antiepileptic Therapy on Serum 25(OH)D3 and 24,25(OH)2D3 Levels in Epileptic Children. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2016;68(2):119
- Zhu WY, **Jiang P# (co-first author)**, He X, Cao LJ, Zhang LH, Dang RL, Tang MM, Xue Y, Li HD. Contribution of NRG1 Gene Polymorphisms in Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of child neurology*. 2016;31(3):271-6.
- 江沛, 蔡骅琳, 李焕德, 陈琳瑶. 代谢组学技术在神经精神性疾病中的应用研究进展. *中国临床药理学杂志*. 2012;28(7):550-3.
- 江沛, 刘艺平, 李焕德, 蔡骅琳, 张利明. 神经活性甾体与精神分裂症. *中国神经精神疾病杂志*. 2012;38(9):572-4.
- Cui C, Song S, Cui J, Feng Y, Gao J, **Jiang P*(corresponding author)**. Vitamin D receptor activation influence on NADPH oxidase (NOX2) activity and protects against neurological deficits and apoptosis in a rat model of traumatic brain injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017(1):9245702.
- Dang R, Zhou X, Tang M, Xu P, Gong X, Liu Y, Jiao H, **Jiang P*(corresponding author)**. Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *European journal of nutrition*. 2018;57(3):893-906.
- Cui C, Cui J, Jin F, Cui Y, Li R, Jiang X, Tian Y, Wang K, **Jiang P*(corresponding author)**, Gao J. Induction of the Vitamin D Receptor Attenuates Autophagy Dysfunction-Mediated Cell Death Following Traumatic Brain Injury. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;42(5):1888-96.
- Dang R, Guo Y, Zhang L, Chen L, Yang R, **Jiang P*(corresponding author)**. Chronic stress and excessive glucocorticoid exposure both lead to altered Neuregulin-1/ErbB signaling in rat myocardium. *Steroids*. 2016;112:47-53.
- Liu Z, Cui C, Xu P, Dang R, Cai H, Liao D, Yang M, Feng Q, Yan X, **Jiang P*(corresponding author)**. Curcumin Activates AMPK Pathway and Regulates Lipid Metabolism in Rats Following Prolonged Clozapine Exposure. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:558.
- Dang R, Zhou X, Xu P, Guo Y, Gong X, Wang S, Yuan F, Yao J, **Jiang P*(corresponding author)**. ω -3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates

- lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and modulates neurotrophic factors in rats: Focus on tPA/PAI-1 system and BDNF-TrkB signaling. *Journal of Functional Foods*. 2017;30:74-80.
- Xiao Y, Guo Y, Dang R, Yan X, Xu P, **Jiang P*(corresponding author)**. A dansyl-based fluorescent probe for the highly selective detection of cysteine based on a d-PeT switching mechanism. *Rsc Advances*. 2017;7(34):21050-3.
- Wu YQ, Dang RL, Tang MM, Cai HL, Li HD, Liao DH, He X, Cao LJ, Xue Y, **Jiang P*(corresponding author)**. Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Alleviates Doxorubicin-Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotoxicity in Rats: Involvement of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Nutrients*. 2016;8(4):243.
- Dang R, Guo Y, Cai H, Yang R, Liang D, Lv C, **Jiang P*(corresponding author)**. Effects of prolonged antipsychotic administration on neuregulin-1/ErbB signaling in rat prefrontal cortex and myocardium: implications for the therapeutic action and cardiac adverse effect. *The Journal of toxicological sciences*. 2016;41(2):303-9.
- Guo Y, Cai H, Chen L, Liang D, Yang R, Dang R, **Jiang P*(corresponding author)**. Quantitative profiling of neurotransmitter abnormalities in the hippocampus of rats treated with lipopolysaccharide: Focusing on kynurenine pathway and implications for depression. *Journal of neuroimmunology*. 2016;295-296:41-6.
- Wang H, Xu P, Liao D, Dang R, He X, Guo Y, **Jiang P*(corresponding author)**. Association between NLPR1, NLPR3, and P2X7R Gene Polymorphisms with Partial Seizures. 2017;2017:9547902.
- Yang G, Wang H, He X, Xu P, Dang R, Feng Q, **Jiang P*(corresponding author)**. Association between BACE1 gene polymorphisms and focal seizures in a Chinese Han population. *Medicine*. 2018;97(13):e0222.
- Liao D, Guo Y, Xiang D, Dang R, Xu P, Cai H, Cao L, **Jiang P*(corresponding author)**. Dysregulation of Neuregulin-1/ErbB signaling in the hippocampus of rats after administration of doxorubicin. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:231-9.
- Sheng L, Xue Y, He X, Zhu Y, Li H, Wu Y, Dang R, Tang M, **Jiang P*(corresponding author)**. Effects of repeated administration of rifampicin and isoniazid on vitamin D metabolism in mice. *Steroids*. 2015;104:203-7.
- Ying X, Xin H, Li HD, Yang D, Miao Y, Cai HL, Tang MM, Dang RL, **Jiang P*(corresponding author)**. Simultaneous Quantification of 25-Hydroxyvitamin D3 and 24,25-Dihydroxyvitamin D3 in Rats Shows Strong Correlations between Serum and Brain Tissue Levels. *International Journal of Endocrinology*. 2015;2015(4):296531.
- Dang R, Cai H, Zhang L, Liang D, Lv C, Guo Y, Yang R, Zhu Y, **Jiang P*(corresponding author)**. Dysregulation of Neuregulin-1/ErbB signaling in the

prefrontal cortex and hippocampus of rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Physiology & behavior*. 2016;154:145-50.

Dang R, Guo Y, Zhu Y, Yang R, Cai H, **Jiang P*(corresponding author)**. Chronic administration of calcitriol enhanced neuregulin-1/ErbB signaling in rat myocardium. *Die Pharmazie*. 2016;71(4):192-5.

党瑞丽, 郭玉金, 朱运贵, **江沛*(通讯作者)**. 维生素 D 的神经免疫调节作用及其与神经精神疾病的关系. *中华临床营养杂志*. 2015;23(4):250-4.

Tang M, **Jiang P**, Li H, Liu Y, Cai H, Dang R, Zhu W, Cao L. Fish oil supplementation alleviates depressant-like behaviors and modulates lipid profiles in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15:239.

Tang M, **Jiang P**, Li H, Cai H, Liu Y, Gong H, Zhang L. Antidepressant-like effect of n-3 PUFAs in CUMS rats: role of tPA/PAI-1 system. *Physiology & behavior*. 2015;139:210-5.

Zhang LH, Cai HL, **Jiang P**, Li HD, Cao LJ, Zhu WY, Dang RL, Deng Y. Simultaneous determination of multiple neurotransmitters and their metabolites in rat brain homogenates and microdialysates by LC-MS/MS. *Analytical Methods*. 2015;7(9):3929-38.

Cai HL, Tan QY, **Jiang P**, Dang RL, Xue Y, Tang MM, Xu P, Deng Y, Li HD, Yao JK. A potential mechanism underlying atypical antipsychotics-induced lipid disturbances. *Translational psychiatry*. 2015;5:e661.

二、总体思路和计划

1、总体思路

(主要包括: 技术路线和拟突破的关键技术等)

研究内容与技术路线

1. VD 对 P2X7R/ NLRP3 通路的抑制作用及对 ATP 诱导小胶质细胞激活的影响

1.1 VD 对 P2X7R 抑制作用: 选用原代培养的大鼠小胶质细胞, 将其与 1,25(OH)₂D₃ 或阳性对照 P2X7R 抑制剂 A804598 共培养, 随后分别给予 ATP 或 P2X7R 的特异性激动剂 BzATP, 用 Fluo-3/AM 荧光探针检测细胞内 Ca²⁺ 的浓度, 并考查由 P2X7R 所介导的细胞孔道的形成对特异性的荧光染料 Yo-Pro-1 的通透性。

1.2 VD 对 ATP 诱导的小胶质细胞激活及 P2X7R/ NLRP3 通路的影响: 前期研究表明, ATP 本身便可激活 P2X7R 受体, 并引起炎症因子的释放。因此, 在上一步实验后, 应用免疫荧光法考察小胶质细胞激活, 分析该炎症通路和 IL-1β 前体与成熟形式蛋白表达, 并测定 IL-6、IL-10 和 TNFα 等炎症因子的水平。

2. 应用海马器官型脑片考察 VD 对神经元的保护作用

大鼠海马器官型脑片 (organotypic hippocampal slice cultures, OHSCs) 拥有完整的神经元——胶质细胞相互作用, 本项目拟在上一步确证 VD 对小胶质细胞 P2X7R 通道的抑制作用的基础上, 进一步考察 VD 经由 P2X7R/NLRP3 通路对神经元的保护作用。

2.1 VD 缺乏 (充足) 大鼠模型的建立及 OHSCs 的分离培养: 通过改变大鼠饮食中 VD 含量, 并采用白炽灯维持昼夜节律 (不含紫外线), 课题组现已成功构建大鼠体内 VD 水平梯度, 建立 VD 缺乏/充足模型。分离培养不同 VD 水平大鼠的 OHSCs, 随后采用 Fluo-3/AM 荧光探针检测 VD 本身细胞内 Ca²⁺ 的浓度的影响, 并考察 P2X7R 所介导的细胞孔道的形成对特异性的荧光染料 Yo-Pro-1 的通透性, 观察基线水平。

2.2 VD 对外源 ATP 引起的神经炎症及凋亡的保护作用: 我们在上一步分离培养不同 VD 水平大鼠的 OHSCs 后, 进一步考察 VD 对 P2X7R 过度激活所产生的

神经保护作用：1)将三种不同 VD 水平大鼠的 OHSCs 分别与 ATP 或 BzATP 共培养，随后考察细胞内 Ca^{2+} 的浓度及对荧光染料 Yo-Pro-1 的通透性；2)采用 PI 染色及 CD11B、IBA-1 免疫荧光标记，分别对 P2X7R 激活引起的凋亡与炎症进行考察，并用 Brdu 及 DCX 染色观察神经增殖与分化；3)对 P2X7R/NLRP3/ASC/Caspase-1 通路及下游炎症因子水平进行分析，并考察 Bcl-x1/Bax 及 capase-3 的表达。

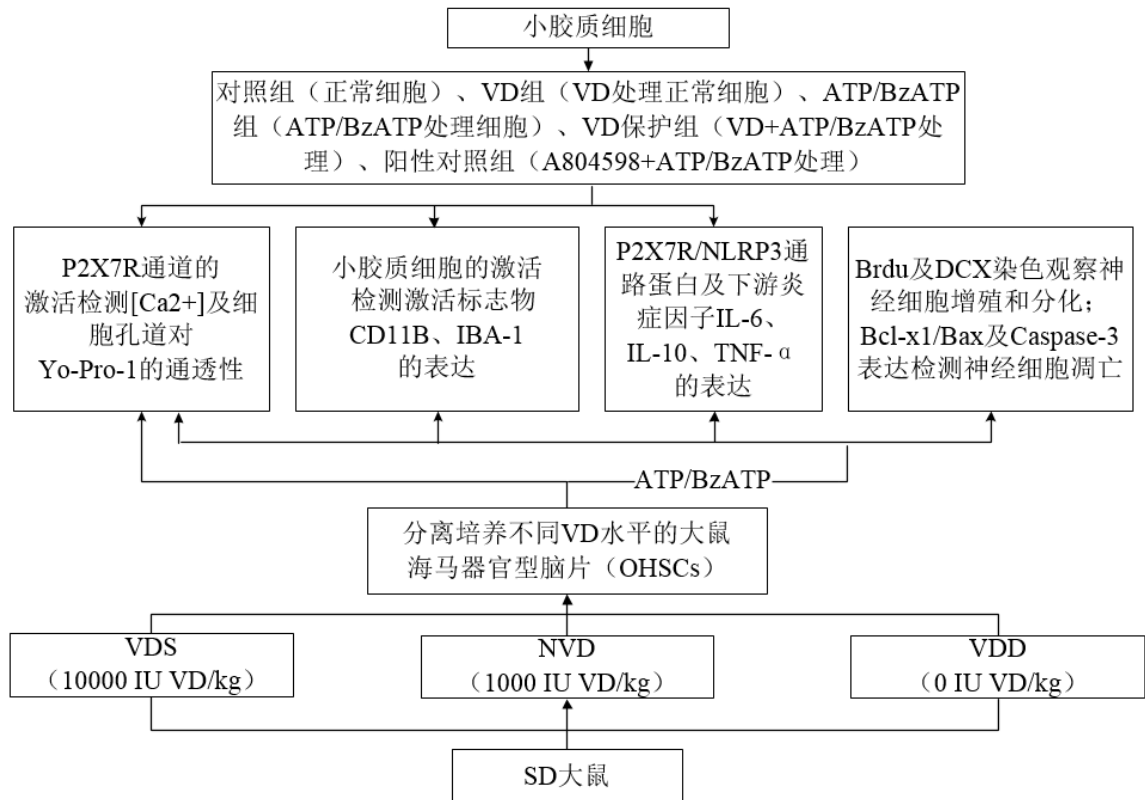


图 9. 体外研究示意图

3. 动物实验验证 VD 的免疫调节及抗抑郁作用

3.1 模型构建与行为学观察 同 2.1 中方法一致，建立 VD 缺乏/充足模型。对体内 VD 水平进行测定，确定模型成功后，分别给予三种不同 VD 水平的大鼠 CMS 或 LPS 诱导抑郁样行为。使用糖水偏好实验、强迫游泳实验、悬尾实验、新环境进食抑制实验和旷场实验对抑郁样行为进行评价，考察 VD 对行为学改变的影响。

3.2 在体探究 P2X7R/ NLRP3 通路在 VD 抗抑郁中的作用 1) 利用微透析技术，对细胞外游离的 ATP 水平进行分析；2) 在 VD 缺乏组中，脑内微量泵入

P2X7R 特异性阻断剂 A804598，随后观察行为学的变化，确证 VD 缺乏所引起的对应激敏感性的增加，是因 P2X7R 过度激活引起；3) 在 VD 充足组中，脑内微量注射 BzATP，观察激活 P2X7R 是否可以逆转 VD 的抗抑郁作用；4) 测定 P2X7R/NLRP3/ASC/Caspase-1 通路相关蛋白和 mRNA 的表达，测定 pro-IL-1 β 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF α 等炎症因子脑内和血清的水平，以及与抑郁症有密切关系的 IDO、iNOS 以及 ROS/RNS 等炎症相关通路，确证 VD 的免疫调节作用及对 P2X7R/NLRP3 通路的影响；5) 使用 HE、Iba-1、CD11B、DCX 和 Brdu 染色考察 VD 对应激引起的炎症、凋亡以及神经元增殖的影响，进一步明确 VD 的神经保护作用。

3.3 神经递质及代谢轮廓分析 利用课题组已搭建好的代谢组学平台，对大鼠不同脑区神经递质及代谢产物进行测定，尤其针对与炎症密切相关的色氨酸的 KYN 代谢通路进行分析，并对脑内和血清的代谢轮廓进行分析，确定代谢轮廓的转归情况，筛选 VD 干预下的生物标志物。

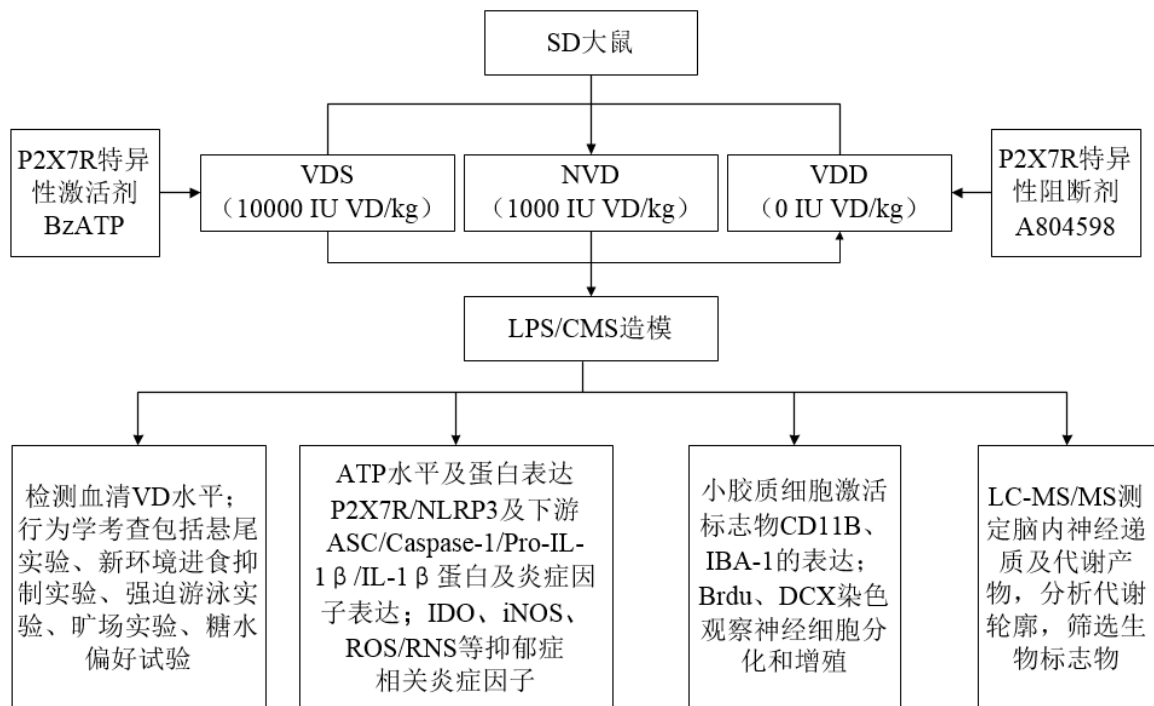


图 10. 动物实验示意图

4. VD 补充治疗对抑郁症患者症状及炎症的影响

4.1 VD 补充及症状评分 为进一步确证 VD 的干预作用，克服现有临床研究因基线 VD 水平不同、剂量太小、以及补充时间和跟踪时间不同等因素而导致结果不一致，本研究拟纳入 200 例 VD 缺乏的中轻度抑郁症患者（25(OH)D 水平低于 20 ng/ml），分为对照组和补充组，分别给予安慰剂和 10 周以上的 VD 补充辅助治疗（50kIU/wk），同时严密监测血清钙磷、25(OH)D 及 1,25(OH)₂D 水平，并对抑郁症状进行评分，观察 VD 补充对抑郁症状的改善作用。

4.2 VD 补充对 P2X7R 激活及炎症水平的影响 分离培养以上抑郁症患者的 PBMCs，观察 VD 补充对 BzATP 引起的 PBMCs 中 Ca²⁺内流浓度的影响，同时观察细胞对荧光染料 Yo-Pro-1 的通透性，确证 VD 在改善抑郁症状的同时，也对 P2X7R 有一定抑制作用。随后对 PBMCs 中下游炎症通路的表达进行考查，测定血清炎症因子，建立 VD 水平、炎症通路及抑郁症状三者之前的相关性。

4.3 抑郁症患者血清神经递质及代谢轮廓分析 对患者血清内的主要神经递质及代谢产物进行定量分析，对血清代谢谱进行全扫描，与动物实验数据进行对比，进一步筛选生物标志物，并验证 VD 治疗效果。

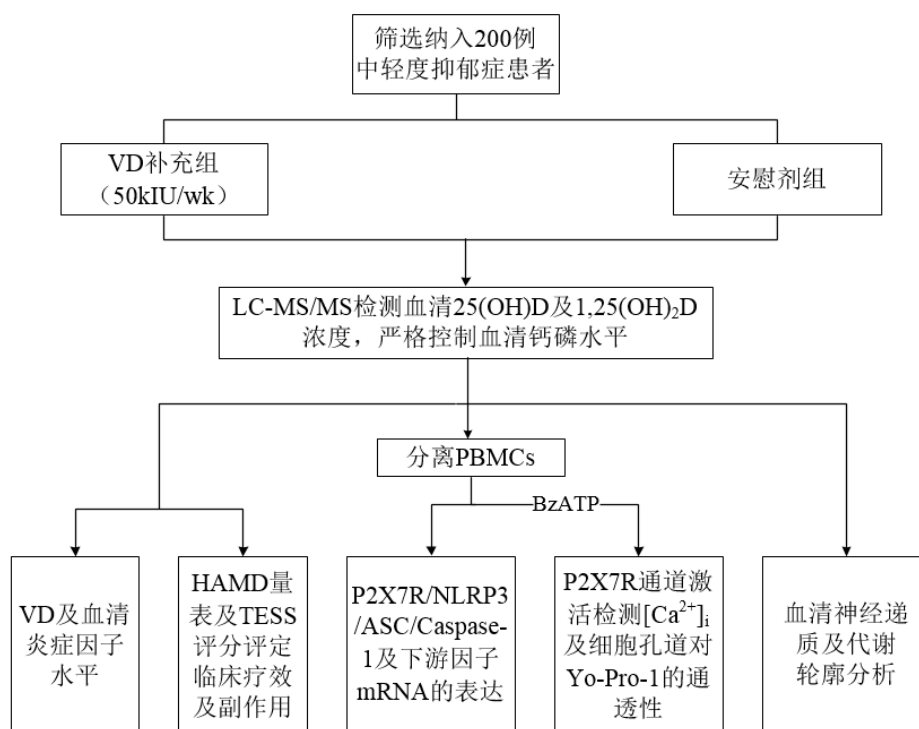
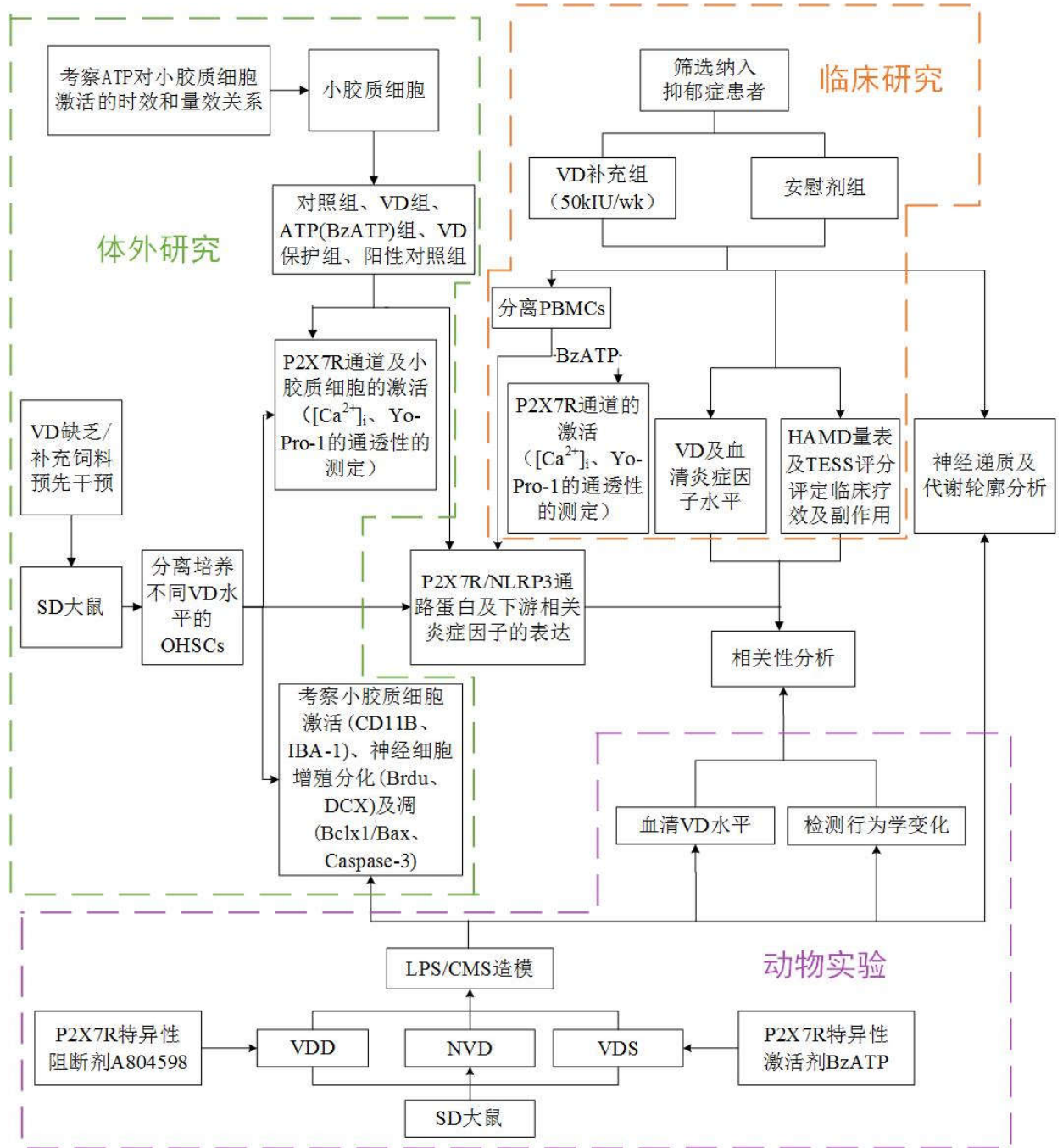


图 11. 临床研究示意图

技术路线总图:



2、工作计划

(分年度列出 5 年工作计划)

2019 年 1 月—2019 年 12 月

- (1) 联系和购买实验所需试剂盒、对照品、细胞、实验动物等;
- (2) 完善动物造模, 行为学评价和组织取样等;
- (3) 对 VD 与抑郁症的关系进行反复论证, 并结合中枢神经系统炎症、神经凋亡和增殖等数据进一步确证 VD 的免疫调节和神经保护作用。

2020 年 1 月—2020 年 12 月

- (1) 完成动物实验中相关组织切片、基因蛋白表达、炎性因子、VD 水平等测定工作;
- (2) 体外实验部分, 培养胶质细胞和 OHSCs, 探究 VD 对 P2X7R 和下游炎症通路的调节作用, 证明 VD 的神经保护和免疫调节作用及其对 P2X7R 的抑制有关;

2021 年 1 月—2021 年 12 月

- (1) 完成所有动物实验, 相关组织切片、基因蛋白表达、炎性因子、VD 水平等测定工作;
- (2) 体外实验部分, 培养胶质细胞和 OHSCs, 探究 VD 对 P2X7R 和下游炎症通路的调节作用, 证明 VD 的神经保护和免疫调节作用及其对 P2X7R 的抑制有关;

(3) 开始临床样本的入组收集

2022 年 1 月—2022 年 12 月

(1) 对 VD 与抑郁症的关系进行反复论证, 完善补充体内体外实验, 并结合中枢神经系统炎症、神经凋亡和增殖等数据进一步确证 VD 的免疫调节和神经保护作用, 并进行代谢组学研究。

(2) 筛选临床样本, 进行 VD 补充治疗的随机对照临床研究, 开始跟踪随访临床资料, 继续收集临床样本。

2023 年 1 月—2023 年 12 月

(1) 完成临床试验样本收集和症状评分数据整理;

(2) 对完成 PBMCs 的分离与培养, 测定 PBMCs 中相关 mRNA 的表达, 对血清中炎症因子, 25(OH)D₃ 和 1,25(OH)₂D₃ 进行测定分析;

(3) 阶段性整理分析数据, 撰写科研论文, 开展学术交流; 根据研究开展情况, 随时进一步补充相应实验, 力求在新的理论上有所发现和突破; 全面整理数据, 进行课题总结和成果申报工作, 提出后续研究计划。

三、 目标任务

1、 科研攻关目标

(主要包括: 拟申请立项的重点项目等)

申请人长期从事神经药理学研究及维生素 D 的神经活性探索, 现已以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 34 篇, 在该领域积累了扎实的研究基础, 在本项目的基础上, 将继续申请国家自然科学基金重点项目、山东省重点研发计划、国家、省优秀青年项目等。

2、 科技成果目标

(主要包括: 科技奖励、高水平论文和专利等)

2.1. 对 VD 在抑郁症发病与治疗中的作用进行确证, 在大量研究基础上, 针对性的提出 VD 既可以调控 P2X7R/NLRP3 通路及下游炎症相关蛋白的表达, 也可以快速的作用于 P2X7R 引起的 Ca²⁺内流的增加, 是天然的 P2X7R 抑制剂。鉴于 P2X7R/NLRP3 通路在免疫反应中的重要作用, 本项目的开展将极大的丰富 VD 的多种活性, 为 VD 在其他多种免疫相关疾病作用的作用奠定一定的理论基础。本项目也将进一步丰富抑郁症的炎症假说, 将基础研究同临床研究相结合, 验证参与“炎性”抑郁的重要靶标, 寻找与临床发病及症状相关性指标, 为探寻新的抗抑郁靶点提供思路。同时对 VD 的临床辅助治疗作用进行初步验证, 鉴于抑郁症患者普遍伴随着 VD 水平的缺乏和骨密度的降低, 论证 VD 补充治疗是否不仅能降低抑郁患者骨质疏松的风险, 同时也能更好的改善抑郁症状, 为 VD 的深入开发及抑郁症的防治提出新的措施。

2.2. 将动物实验同临床相结合, 利用代谢组学手段筛选出 6-10 个有价值的生物标志物, 进行比对分析, 寻找可用于诊断、预防及判断预后的相关生物标志, 并结合分子探针手段, 开发相应试剂盒, 申请 3-5 项有重大转化价值的专

利技术。并在申请人前期扎实的的前期基础上，基于本项目的重大科学意义和临床价值，继续发表 IF>5 的 SCI 论文 4-9 篇，冲刺国家级及省级科技进步奖。

3、经济社会效益目标

据世界卫生组织最新报道，全球有超过 3.5 亿抑郁症患者，每年约有 80 万人死于抑郁引起的自杀，现已成为 15-29 岁年龄段人群的第二大死亡原因。预计到 2020 年，抑郁症很可能成为除心脏病之外给社会经济造成最大负担的一种疾病。然而，现有常规药物治疗对约三分之一的抑郁症患者无效。因此进一步阐明抑郁症的病理过程，寻找新的作用靶点，探索新的防治策略已迫在眉睫。

本项目首次针对与抑郁症“炎症假说”密切相关的 P2X7R/NLRP3 通路，在大量研究的基础上，提出 VD 不仅可以作用于该通路调控 P2X7R/NLRP3 及下游炎症因子的转录与表达，还可以直接作用与 P2X7R 这一配体门控性的 Ca²⁺通道，通过精准的调控细胞内 Ca²⁺内流，影响 NLRP3 炎症小体的聚集与激活，进而起到神经免疫调控和抗抑郁作用。VD 作为重要营养元素价格低廉，安全性好，其在抑郁症防治中作用的确证将极大的降低社会经济负担，同时对 VD 免疫调节机制的深入探讨也将为 VD 在其他自身免疫相关疾病防治中的作用奠定重要的理论基础，为 VD 这一传统的钙磷稳态调节剂的深入开发提供新的思路。

4、其他目标

（主要包括：人才培养、团队建设等）

研究团队现拥有博士 4 人，硕士 12 人，且年龄均在 35 岁以下，是一支年轻科研团队，本项目的实施将深化人才培养与引进，助推团队创新能力和创新水平的提高，同时在本项目支持下，预计培养硕博研究生 7-10 名，加快建立优秀的青年学术人才队伍。

四、保障措施

1、实验室及仪器设备保障

课题组所在济宁市第一人民医院拥有包括神经内科在内的 16 个临床重点专科，同时也是济宁医学院第一临床学院，山东省医学科学院附属医院，国家卫计委脑卒中筛查与防治基地、国家卫计委高级卒中中心、国家药物临床试验机

构。同时，济宁药物研发中心，由济宁医学院、济宁市高新区和辰欣药业共同建设。中心建有气相实验室、液相实验室、核磁共振实验室、衍射实验室等 18 间功能实验室，配套设施齐全，功能完善。拥有 600M 核磁共振波谱仪、高效液相色谱-质谱联用仪、气象色谱-质谱联用仪、傅里叶变换红外光谱仪、X 射线单晶衍射仪等 91 余台/套高、精、尖仪器设备。济宁医学院精神卫生学院行为医学实验室为山东省重点实验室，《中华行为医学与脑科学杂志》主办单位，设有精神医学临床实验室、行为观察实验室、精神医学遗传实验室、精神医学生物化学实验室和电生理实验室五个专业实验室，拥有脑立体定位仪、库仑阵列电化学检测器和设施功能齐全的动物饲养及行为学观察相关设备。同时，本课题所依托济宁医学院附属第一人民医院医学研究中心为济宁市医学研究所，作为全市的医学科学研究平台，现拥有 ABI 荧光定量 PCR 仪，Bio-Rad 电泳设备及凝胶自动成像系统，precellys 24 多功能组织均质器（法国 Bertin 公司），Waters 液相色谱仪-三重四级杆串联质谱，CO₂ 细胞培养箱，荧光显微镜，相差倒置显微镜，冰冻/石蜡切片机，低温高速离心机等，完全具备完成本项目所需的实验条件。此外，项目申请人长期针对 VD 的神经活性和抑郁症的病理机制展开研究，相关工作已以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 34 篇，积累了丰富的研究经验。同时，申请人精通多种液相色谱技术、分子生物学实验技术、脑立体定位和微透析技术，并能够有效的对动物行为学进行评价。并且课题组成员中，有熟练掌握细胞培养、western-blot、免疫荧光/组化及动物饲养和造模的专业技术人员。这些条件为本项目的顺利开展提供了保证。

2、配套资金保障

济宁市第一人民医院现已为申请人所在团队投入平台建设及科研经费累计 500 万元以上，在项目获批后更将积极为申请人建设工作平台、制定培养扶持方案、提供科研配套经费、配备研发力量、落实其他保障措施等；投入配套资金不低于 100 万元。

3、生活保障

申报人 2015 年全职引进济宁市第一人民医院工作后，单位已提供一次性安家费 30 万元，现已在济宁安家落户，为申报人的基本生活提供了一定的保障。